# 3D 水凝胶压应力模型建立及压应力对成骨细胞的影响

张玲莉，仝晓阳，郭健民，雷乐，邹军*

上海体育学院，上海 200438，中国

**摘要：目的：**通过建立 3D 水凝胶细胞模型，采用不同强度、频率、时间对 MC3T3-E1 细胞进行机械加压干预，进而探讨促进成骨细胞生长的适宜压应力方案。**方法：**设计不同强度、频率、时间的压应力梯度方案对成骨细胞 MC3T3-E1 进行干预。加压干预结束后即刻收集细胞，对样本中的 *ATF4*、*ALP*、*Runx2*、*Osteocalcin*、*RANKL* 和 *RANK* mRNA 进行定量检测。**结果：**经统计学分析后发现不同强度和频率对 *ALP*（$P<0.05$）、*Runx2*（$P<0.01$）交互作用显著。此外，4h 加压 *Runx2* 的表达量比 12h 加压的高（$P<0.05$）；4h 加压 *RANKL* 的表达量比 12h 加压的低（$P<0.05$）。**结论：**确定了压力强度和频率后，对 3D 细胞水凝胶模型施加一段时间的压应力发现，以 1%强度、0.5Hz 频率、4h 的压应力干预方案能够促进成骨细胞系的生长。

**关键词：**压应力，强度，频率，时间，成骨细胞系

# 3D Hydrogel Compression Model and Effect of Cyclic Compression on Osteoblast Differentiation

ZHANG Ling-li, TONG Xiao-yang, GUO Jian-min, Lei Le, ZOU Jun

Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China

**Abstract: Objective:** 3D hydrogel cell model was established, and cyclic compressive loading on MC3T3-E1 cell with different intensities, frequencies and durations was applied, in order to research the suitable solution about promoting the osteoblast differentiation with cyclic compression. **Methods:** Cyclic compressive loading on MC3T3-E1 cell was applied with different intensity, frequency and time. After

*国家自然科学基金项目（81572242）；上海市人类运动能力开发与保障重点实验室（上海体育学院，11DZ2261100）资助。

作者简介：张玲莉（1989-），女，汉族，安徽淮南市人，博士生，研究方向：运动与骨代谢。

通讯作者：邹军（1969-），男，教授，博导，Tel：021-51253129，Email：zoujun777@126.com。

compressive loading finished, the total RNA extraction from cell-gel constructs were performed and quantified *ATF4, ALP, Runx2, Osteocalcin, RANKL* and *RANK* mRNA. **Results:** *RANKL* and *RANK* mRNA expression significantly with different frequencies cyclic compressive loading ($P<0.05$), and *ALP* mRNA ($P<0.05$) and *Runx2* mRNA ($P<0.01$) expression significantly with different intensities and frequencies cyclic compressive loading ($P<0.05$). Meanwhile, *Runx2* mRNA expression with 4h significant higher than 12h ($P<0.05$), and *RANKL* mRNA expression with 4h significant lower than 12h ($P<0.05$). **Conclusion:** Determine the stress intensity and frequency, 1% intensity, frequency of 0.5 Hz, 4 h of cyclic compression intervention could promote the growth of osteoblasts-like cells in the 3D hydrogel model.

**Key words:** compression, intensity, frequency, duration, osteoblasts-like cells

骨骼内稳态受多个因素的影响，特别是机械载荷和生长因子信号通路影响颇多[1]。系统研究细胞对力学刺激信号的转导和响应主要建立于体外特定力学传导装置下细胞培养的基础上[2]，可以将机械载荷转化为细胞内生化反应[3]。

目前机械牵张力作用于细胞的研究较多，而压力作用于细胞的研究较少，主要是由于细胞压应力模型的建立尚不成熟，同时不同强度、频率、时间的压应力对成骨细胞的影响也不同。因此，本研究在之前压应力细胞模型的基础上，尝试建立 3D 水凝胶细胞模型，同时采用不同强度、频率、时间压应力对 MC3T3-E1 细胞进行机械干预，观察压应力对成骨细胞分化的影响，探讨促进成骨细胞分化的适宜压应力方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 成骨细胞系的培养

成骨细胞系 MC3T3-E1（ATCC，CRL-2594）在 10cm 规格的培养皿中复苏后采用α-MEM 培养液（含 10%FBS+1%PS），在 37℃、5%$CO_2$ 的培养箱中进行常规细胞培养。每 2 天换一次液，细胞长至 70-80%融合时进行传代。

### 1.2 3D 细胞水凝胶建模

10cm 规格的培养皿中细胞量达到 90%左右进行干预，将细胞用胰酶消化后

转移至 15ml 离心管中，1000RP 5min 离心后弃上清留沉淀，10%的无菌蔗糖溶液清洗两遍，加入 100ul 的无菌蔗糖溶液进行重悬，此时细胞计数浓度可以达到 1-2*10$^{7}$cells/ml。一般建议细胞浓度在这个范围内，否则细胞量过低，在与水凝胶混合后极易溶解在培养液中。

从 4°C 冰箱中将 BeaverNano™3D 细胞水凝胶取出，室温放置 30min 降低水凝胶原溶液的粘性成液态，加样器取 100ul 的细胞水凝胶置于 1.5ml 无菌 EP 管中。在吸取的过程中容易产生气泡，因此做 1000RP 5min 离心处理。

将 100μl 细胞蔗糖重悬液缓慢地注入到水凝胶中，要均匀要缓慢，尽可能不产生气泡。将细胞蔗糖水凝胶混合液混匀后，每 100μl 注入到 Flexcell 公司生产的底部具有弹性模的专用 6 孔板（BioFlex® Plate 弹性膜 6 孔板），此前每个孔中已经加入 2ml α-MEM 培养液。一般 10cm 规格的培养皿细胞达到 80-90%融合时，建议种两个孔。将培养板放置培养箱内，15min 后换成含诱导分化剂的培养液（含抗坏血酸 L、β-甘油磷酸钠）尽快改变水凝胶的酸度。二次换液后，将培养板重新放置培养箱待到细胞蔗糖水凝胶混合液凝固后即可进行加压干预。

细胞

蔗糖水溶液

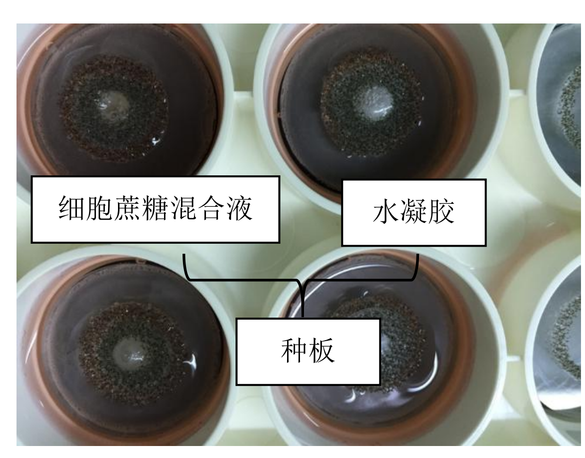



图 1 细胞蔗糖水凝胶混合液种板示意图

Fig.1 Hydrogel cell model

## 1.3 压应力方案

细胞种板后，第二天对细胞进行压应力干预（Flexcell-FX5000 Compression System，USA）——一种由计算机控制培养箱里的细胞压应力装置连接外界泵提供动力，设计不同强度、频率的压应力梯度方案对 3D 水凝胶进行干预（如表 1 所示），对照组细胞不进行干预正常培养，每组 2 个孔。在此基础上，通过统计学计算出有效的强度和频率压应力方案，后做一个时间梯度的方案（如表 2 所

示），每组 2 个孔。加压干预结束后即刻收集细胞，胶块放置 1.5ml RNA free 的离心管中，按照 RNA 的提取步骤，提取 RNA。经过酶标仪检测出每个样本 RNA 的纯度和浓度后，按照反转录试剂盒步骤，将 RNA 反转录为 cDNA。利用试剂盒，对样本中的 *ATF4 mRNA*、*ALP mRNA*、*Runx2 mRNA*、*osteocalcin mRNA*、*RANKL mRNA* 和 *RANK mRNA* 进行定量检测。在 Pubmed 数据库查询小鼠 *ATF-4*、*ALP*、*Runx2*、*osteocalcin*、*RANKL*、*RANK* 和 *GAPDH* 基因引物序列，后用 Primer Express 3.0 软件检测引物（见表 3），引物由上海生工生物工程公司合成。上述实验重复 2 次。

表 1 压应力强度、频率梯度方案
Tab. 1 Model about cyclic compressive with different intensities and frequencies

| 组别 | 强度（%） | 频率（Hz） | 时间（h） |
|---|---|---|---|
| G0 | 0 | 0 | 0 |
| G1 | 1 | 0.5 | 4 |
| G2 | 2 | 0.5 | 4 |
| G3 | 3 | 0.5 | 4 |
| G4 | 1 | 1.0 | 4 |
| G5 | 2 | 1.0 | 4 |
| G6 | 3 | 1.0 | 4 |

表 2 压应力时间梯度方案
Tab. 2 Model about cyclic compressive with different durations

| 组别 | 总加压时间（h） |
|---|---|
| Day 1 | 4 |
| Day 2 | 8 |
| Day 3 | 12 |
| Day 4 | 16 |

表 3 RT-PCR 引物序列一览表
Tab. 3 RT-PCR Primer

| mRNA | Primer | Sequences (5′– 3′) |
|---|---|---|
| ATF4 | Forward | GAGCTTCCTGAACAGCGAAGTG |
| | Reverse | TGGCCACCTCCAGATAGTCATC |
| ALP | Forward | ACTGGCTGTGCTCTCCCTAC |
| | Reverse | GACCTCTCCCTTGAGTGTGG |
| Runx2 | Forward | TTTAGGGCGCATTCCTCATC |
| | Reverse | TGTCCTTGTGGATTAAAAGGACTTG |
| Osteocalcin | Forward | AGCAGGAGGGCAATAAGGTAGT |
| | Reverse | ACCGTAGATGCGTTTGTAGGC |
| RANKL | Forward | CTGATGAAAGGAGGGAGCAC |

| | | |
|---|---|---|
| | Reverse | AAGGGTTGGACACCTGAATG |
| RANK | Forward | CTGACTCTATGCCCGTGTCC |
| | Reverse | ACTGCCTGTGTAGCCATCTGT |
| GAPDH | Forward | CCACAGTCCATGCCATCAC |
| | Reverse | CATACCAGGAAATGAGCTTGAC |

1.4 细胞在水凝胶凋亡检验

确定机械压应力实验方案后，将接种 3D 细胞水凝胶的培养板放置于培养箱中培养确定实验方案的天数后，取出培养板用 1*PBS 清洗，其中两个孔的胶块制成 10μm 冰冻切片，用 Tunel Apo-Green Detection Kit（Biotool）进行凋亡染色，在显微镜拍片观察细胞在水凝胶的存活凋亡情况。

1.5 统计学分析

实验结果皆以 mean±SEM 表示，数据均采用 SPSS13.0 软件包分析处理。针对不同强度和频率梯度压应力的数据，先采用双因素方差分析，确定强度、频率是否产生独立作用或产生交互作用，针对不同因素产生的作用，再采用单因素方差分析或独立样本 T 检验推断组间是否存在差异；针对不同时间梯度压应力的数据，采用单因素方差分析推断组间是否存在差异。$P<0.05$ 表示结果有显著性差异。

## 2 结果

2.1 不同强度和频率压应力对成骨细胞系的作用

针对不同强度和频率梯度压应力的数据，先采用双因素方差分析，发现不同强度和频率对 *ALP*（$P<0.05$）、*Runx2*（$P<0.01$）交互作用显著。不同强度压应力对 *ATF4* 和 *osteocalcin* 并未出现显著作用，不同频率压应力对 *ATF4* 和 *osteocalcin* 也未出现显著作用，且二者没有出现交互作用。

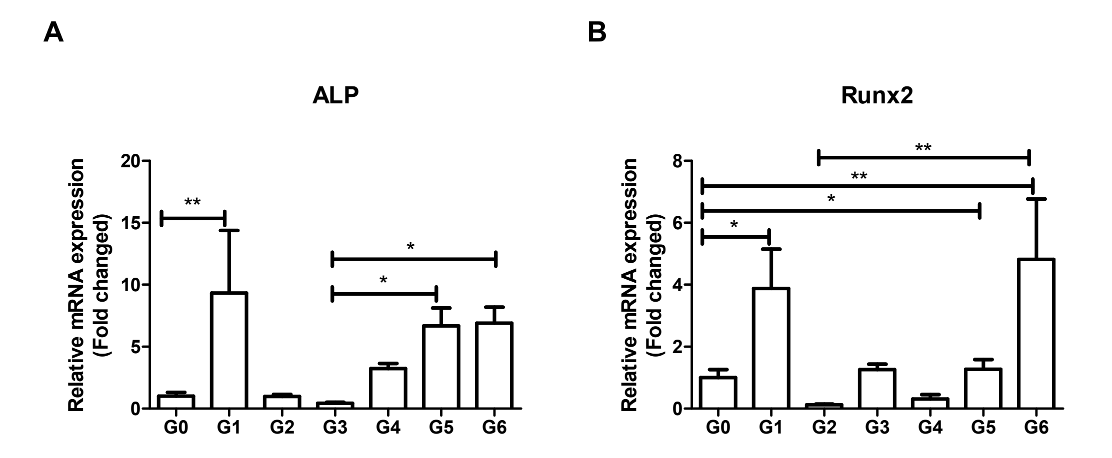



图 2 不同强度和频率压应力对 MC3T3-E1 细胞中 ALP 和 Runx2 mRNA 的影响

Fig. 2 Effect of cyclic compressive on ALP and Runx2 mRNA of MC3T3-E1 with different intensities and frequencies

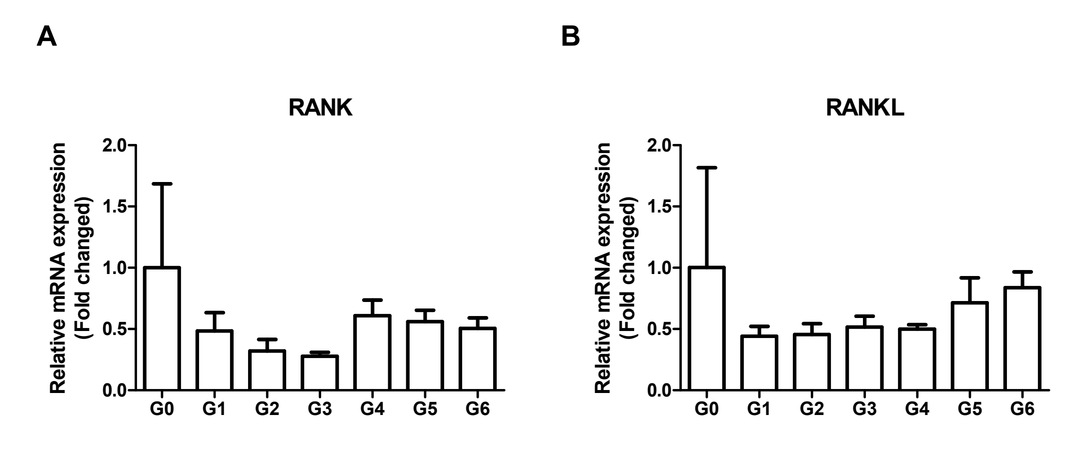



图 3 不同强度和频率压应力对 MC3T3-E1 细胞中 RANK 和 RANKL mRNA 的影响

Fig. 3 Effect of cyclic compressive on RANKL and RANKL mRNA of MC3T3-E1 with different intensities and frequencies

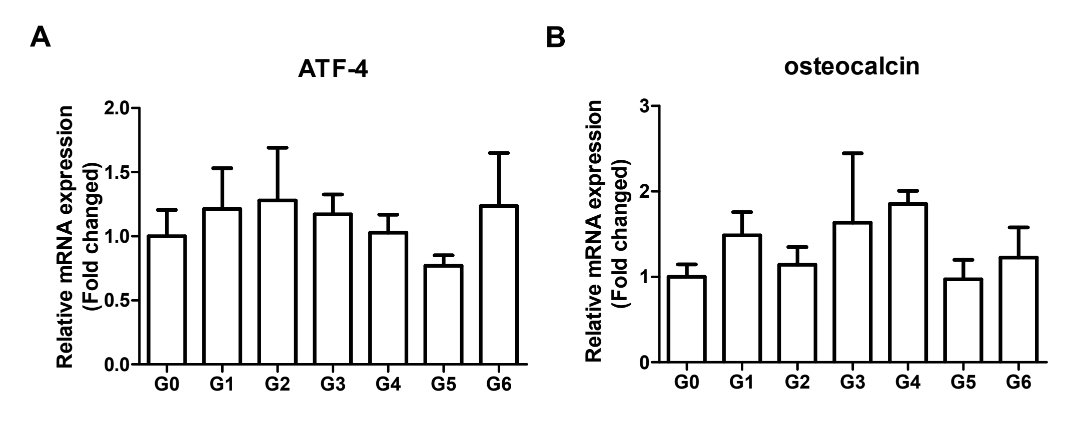



图 4 不同强度和频率压应力对 MC3T3-E1 细胞中 ATF-4 和 Osteocalcin mRNA 的影响

Fig. 3 Effect of cyclic compressive on ATF-4 and Osteocalcin mRNA of MC3T3-E1 with different intensities and frequencies

## 2.2 不同时间压应力对成骨细胞系的作用

针对不同时间梯度压应力的数据，采用单因素方差分析，发现 4h 加压 *Runx2* 的表达量比 12h 加压的高（$P<0.05$）；4h 加压 *RANKL* 的表达量比 12h 加压的低（$P<0.05$）。

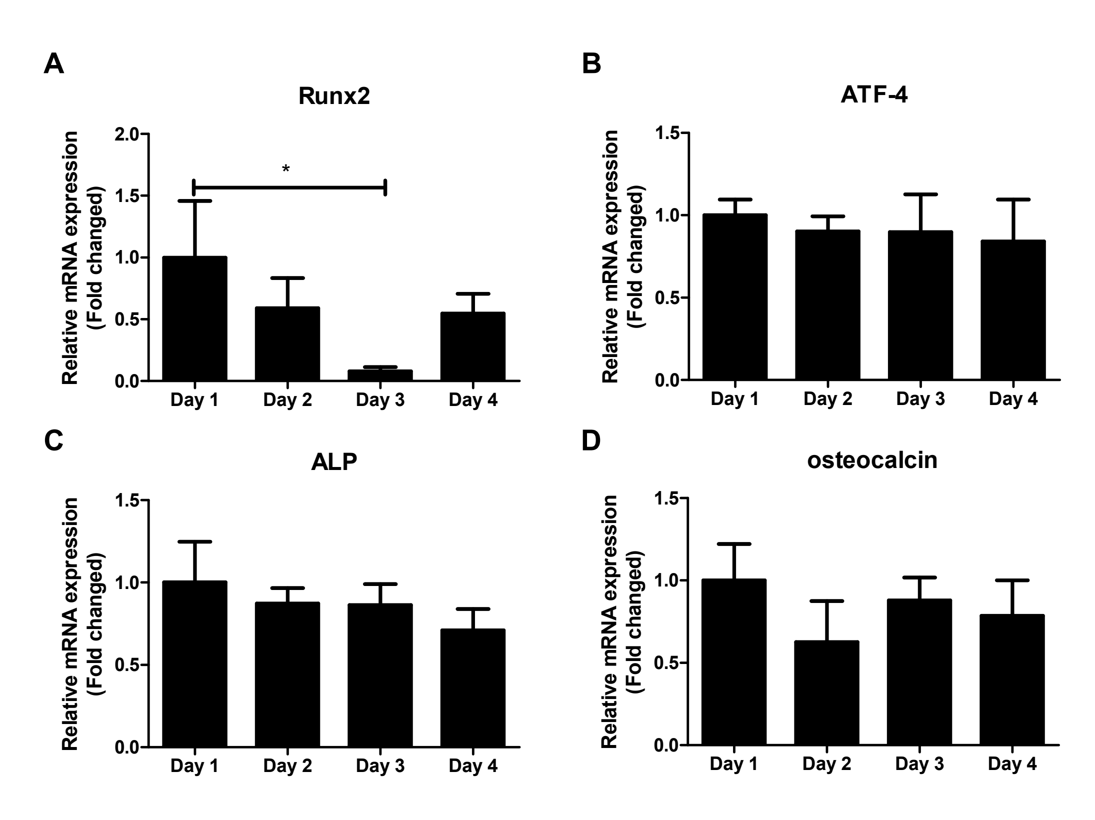



图 5 不同时间压应力下 MC3T3-E1 细胞中基因的表达

Fig. 5 Effect of cyclic compressive on gene expression of MC3T3-E1 with different durations

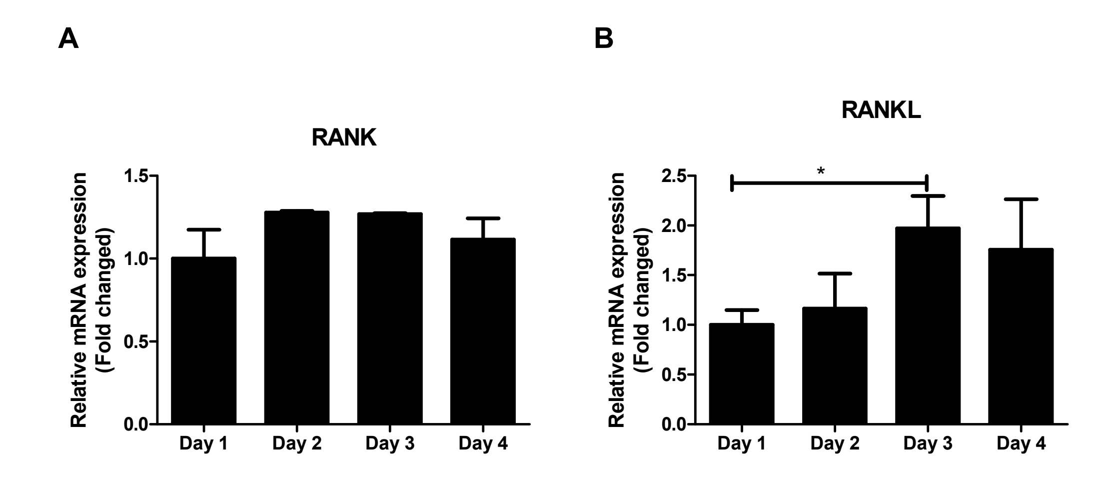


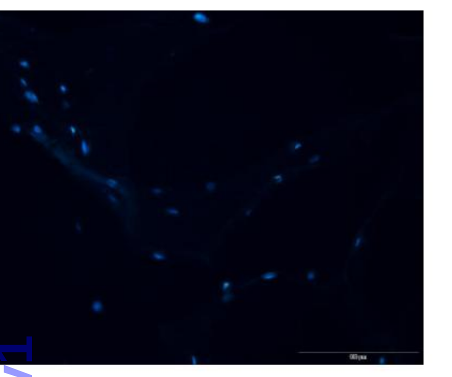

图 6 不同时间压应力下 MC3T3-E1 细胞中 RANK 和 RANKL mRNA 的表达

Fig. 6 Effect of cyclic compressive on RANK and RANKL mRNA of MC3T3-E1 with durations

2.3 凋亡染色的结果

所有的细胞呈现出蓝色荧光，凋亡的细胞核呈现出绿色荧光，从图层合并可以看出 24h 内在水凝胶中的细胞凋亡的数目较少。

Merge TUNEL DAPI



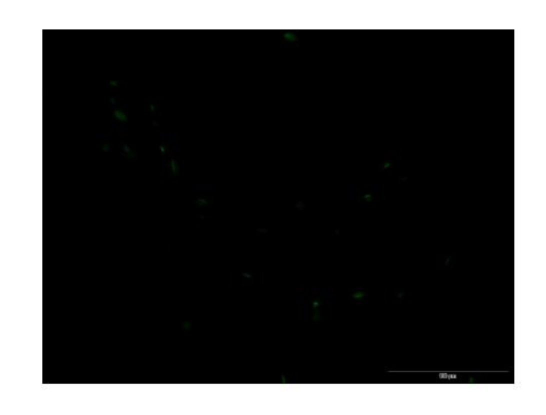




图 7 细胞在水凝胶中凋亡染色结果

Fig.7 Hydrogel cell apoptosis staining



3 分析与讨论

有效的成骨分化高度依赖生长因子信号和机械载荷刺激[4]。骨细胞可以对骨骼变形做出检测和应答，并且认为这些细胞可以将机械性刺激转变为特殊的化学性刺激传给成骨细胞。应力均可刺激成骨细胞的形成和发展，其生物学机制主要通过骨组织感受力学刺激——应力敏感通道和整合素蛋白-细胞骨架结构完成[5]。推测的机械性刺激转变为化学性刺激的两种途径为 G 蛋白偶联受体感受器途径，跨膜整合蛋白、细胞骨架和核转录之间的直接联系。机械载荷通过激活细胞膜上 $Ca^{2+}$通道引起胞外 $Ca^{2+}$内流，促进胞内 $Ca^{2+}$释放，细胞在接受到机械信号后先被跨膜的表面受体如整合蛋白、G 蛋白偶联受体或离子通道等传递到细胞质内，这样机械信号转换为胞质中的生化信号[6]，通过调节第二信使或活化信号分子最终调控细胞迁移、生长、分化和基质重建等行为[7,8]。

成骨细胞是骨细胞中感受应力刺激的效应器，可将机械刺激转化为细胞内化学信号。力学刺激有多种，主要包括重力、牵张力、压力和流体剪切力[9]。在上述力学对成骨细胞的作用研究中以重力[10,11]、牵张力[12,13] 和流体剪切力[14,15]研究居多，压力研究较少；而从人体骨细胞受力情况而言，压应力又必不可少。压应力作用于细胞研究较少，推测主要难度在于细胞的 3D 建模。之前我们课题组选

用的是琼脂糖凝胶，但是琼脂糖凝胶需要在 37℃时才会融化为液态，才可将细胞注射入胶内，但很容易导致细胞大量死亡。后来选用了 BeaverNano™ 水凝胶，是由多肽类生物纳米材料制备而成。其主要成分是 1%（w/v）多肽水溶液（pH:2.0-2.5），无色透明，室温状态下呈液态；同时有极好的生物相容性，采用细胞注射的方式即可植入。相较之于琼脂糖凝胶、胶原蛋白、甲基纤维素凝胶，该水凝胶的工作浓度比较低（0.125%-0.5%），有利于营养物质的扩散和细胞的迁移；纳米纤维孔径为 50-200nm，，理化性质稳定，不会因为温度或湿度等因素的影响而发生改变，更接近细胞原本在体内的微环境；且成分明确，减少了不确定因素对细胞生长的影响。此外，该水凝胶可以填充任意形状的缺损，进入机体后可迅速在损伤部位启动凝胶化过程。

压应力干预机械设备——Flexcell-FX5000 Compression System 存在强度、频率和时间三个变量因素。如果按照严格的三因素实验设计，强度（1%，2%，3%）、频率（0.5Hz，1.0Hz）、时间（4h，8h，12h，16h），加上对照组需要 25 组，再加之细胞种板总量大，总体实验需要重复两遍，实验不具备实际操作性，所以就将实验设计拆分成两部分进行，第一部分先验证强度和频率两因素，在此基础上再验证时间因素。骨细胞中 ALP 和骨骼的钙化作用密切相关，成骨细胞中的 ALP 作用产生磷酸，与钙生成磷酸钙沉积于骨骼中。在细胞增殖晚期，与细胞周期与细胞增殖相关的基因表达下降，而编码细胞外基质成熟的蛋白的基因开始表达，在分化早期主要是 ALP 表达，因此 ALP 被认为是细胞外基质成熟的早期标志。Runx2 是成骨细胞的特异转录因子，对骨组织的形成和重建起着重要作用[9]。OPG/RANKL/RANK 通路是成骨细胞与破骨细胞之间相互作用的信号通道，主要调控破骨细胞的形成、活动和生存[16]。在 OPG/RANKL/RANK 系统中，骨髓基质及成骨细胞分泌一定量的 RANKL 使破骨细胞分化，促进骨吸收，同时也分泌相应数量的 OPG 以防止骨过度吸收[17]。结合实验结果看，强度和频率对 *ALP*（$P<0.05$）、*Runx2*（$P<0.01$）交互作用显著，1%强度、0.5Hz 频率、4h 的压应力成骨细胞的分化作用最优。加上时间因素后，从图 5 和图 6 可发现，在同样的强度和频率压应力方案下，较之于 8h、12h 和 16h，4h 的压应力干预方案能够促进成骨细胞系的生长。这与之前的研究得出的结论"适当的压应力早期能提高成骨细胞的增殖能力并抑制凋亡，促进骨形成"[18]一致。查阅文献发现对成骨样细胞株（MG-63）

施加压力，随着压应力强度的增加，成骨细胞脱落、死亡增加[19]。

在确定 1%强度、0.5Hz 频率、4h 的压应力干预方案后，将接种 3D 细胞水凝胶的培养板放置于培养箱中培养 1 天后，冰切后进行凋亡染色，在显微镜拍片观察细胞在水凝胶中凋亡的细胞较少，表明仍有大量的细胞可以承受 1%强度、0.5Hz 频率、4h 的压应力干预方案。

4 结论

确定了压力强度和频率后，对 3D 细胞水凝胶模型施加一段时间的压应力发现，以 1%强度、0.5Hz 频率、4h 的压应力干预方案能够促进成骨细胞系的生长。

**参考文献**

[1] Iura A, McNerny EG, Zhang Y, et al. Mechanical Loading Synergistically Increases Trabecular Bone Volume and Improves Mechanical Properties in the Mouse when BMP Signaling Is Specifically Ablated in Osteoblasts. PLoS One, 2015,0(10):e0141345.

[2] Brown TD. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. J Biomech, 2000,33(1):3-14.

[3] 艾江平, 谭光宏, 余德涛, 等. 机械刺激对骨质疏松症的影响的研究进展. 实用医学杂志,2012,28(20):3474-3476.

[4] Kopf J, Petersen A, Duda GN, et al. BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signaling events in the BMP pathway. BMC Biol, 2012,10:37.

[5] 田振军,马德. 不同方式刺激与运动训练的成骨作用机理研究.中国体育科技，2009,45(1):115-120.

[6] Mammoto T, Ingber D E. Mechanical control of tissue and organ development. Development, 2010, 137(9): 1407-1420.

[7] Alenghat F J, Tytell J D, Thodeti C K, et al. Mechanical control of cAMP signaling through integrins is mediated by the heterotrimeric Galphas protein. Journal of cellular biochemistry, 2009, 106(4):529-538.

[8] 王玉峰,张赐童,罗雯静,等. 细胞对机械刺激感知的生物力学机制. 现代生物医学进展,2015,15(20):3979-3981.

[9] 顾新丰, 蒋垚. RUNX2 研究进展. 医学分子生物学杂志, 2006,3(1):52-54.

[10] Yan M, Wang Y, Yang M, et al. The effects and mechanisms of clinorotation on proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun, 2015,460(2):327-332.

[11] Camirand A, Goltzman D, Gupta A, et al. The Role of Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) in Osteoblast Response to Microgravity: Mechanistic Implications for Osteoporosis Development. PLoS One,2016,11(7):e0160034.

[12] Arai K, Nagashima Y, Takemoto T, et al. Mechanical strain increases expression of type XII collagen in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. Cell Struct Funct, 2008,33(2):203-210.

[13] Adachi T, Sato K, Higashi N, et al. Simultaneous observation of calcium signaling response and membrane deformation due to localized mechanical stimulus in single osteoblast-like cells. J Mech Behav Biomed Mater, 2008,1(1):43-50.

[14] Riquelme MA, Burra S, Kar R, et al. Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Activated by Prostaglandin E2 PhosphorylatesConnexin 43 and Closes Osteocytic Hemichannels in Response to Continuous Flow ShearStress. J Biol Chem, 2015,290(47):28321-28328.

[15] Qi L, Zhang Y. The microRNA 132 regulates fluid shear stress-induced differentiation in periodontal ligament cells through mTOR signaling pathway. Cell Physiol Biochem, 2014,33(2):433-445.

[16] 戴杰，陈现红，邓伟民．机械振动对骨内细胞效应基础研究进展．中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2014, 7(3): 287-292.

[17] OMINSKY M S, LI X, ASUNCION F J, et al. RANKL inhibition with osteoprotegerin increases bone strength by improving cortical and trabecular bone architecture in ovariectomized rats. J Bone Miner Res, 2008, 23(5): 672-682.

[18] 曹小波,罗应伟,解保生,等.SD 大鼠髁突软骨下骨成骨细胞的原代培养与鉴定．昆明医科大学学报,2014,01:21-24+31.

[19] 米晓晖,吴勇,罗颂椒,等．周期性单轴张、压应力对成骨样细胞增殖的影响．现代口腔医学杂志,2008,06:609-611.